

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**



PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: 11060590 A

(43) Date of publication of application: 02.03.99

(51) Int. Cl

C07H 15/04**A61K 31/70****A61K 31/725****C08B 37/00**

(21) Application number: 09240298

(22) Date of filing: 22.08.97

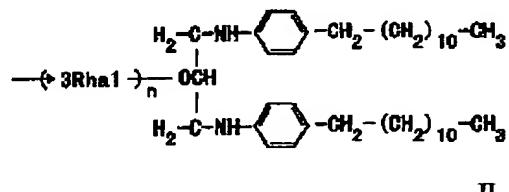
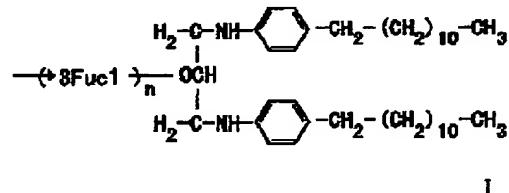
(71) Applicant: YAKULT HONSHA CO LTD

(72) Inventor: NAGAOKA MASATO
SHIBATA HIDEYUKI
KIMURA TOSHIKO
HASHIMOTO HIDESUKE(54) OLIGOFUCOSE DERIVATIVE OR
OLIGORHAMNOSE DERIVATIVE AND ITS
PRODUCTION

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain the subject new compound having higher uniformity than other polysaccharides, promoting actions on ulcers and inhibitory actions on fixation of *Helicobacter pylori*, capable of preventing and treating inflammations of gastric mucosa changing to ulcers and gastric cancer.

SOLUTION: This compound is an oligofucose derivative or an oligorhamnose derivative of the formula Y-OCH(CH₂NHR)₂ (Y is an oligofucose or oligorhamnose component 2-20 polymerization number and a part of hydroxyl group is an oligosaccharide residue; R is phenyl, a higher alkylphenyl, etc.), such as an oligofucose hexylaniline derivative of formula I or an oligorhamnose dodecylaniline derivative of formula II. The objective derivative is obtained by a process for converting the saccharide residue of a reduction end of oligofucose or oligorhamnose into an aldehyde group by oxidation decomposition, treating the aldehyde group with a corresponding alkylamine to form a Schiff base and reducing the Schiff base.



(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	F I
C 0 7 H 15/04		C 0 7 H 15/04
A 6 1 K 31/70	ADZ	A 6 1 K 31/70
31/725	ACL	31/725
C 0 8 B 37/00		C 0 8 B 37/00
		Z

審査請求 未請求 請求項の数4 FD (全8頁)

(21)出願番号	特願平9-240298	(71)出願人	000006884 株式会社ヤクルト本社 東京都港区東新橋1丁目1番19号
(22)出願日	平成9年(1997)8月22日	(72)発明者	長岡 正人 東京都港区東新橋1丁目1番19号 株式会社ヤクルト本社内
		(72)発明者	柴田 英之 東京都港区東新橋1丁目1番19号 株式会社ヤクルト本社内
		(72)発明者	木村 逸子 東京都港区東新橋1丁目1番19号 株式会社ヤクルト本社内
		(74)代理人	弁理士 佐藤 正年 (外1名) 最終頁に続く

(54)【発明の名称】オリゴフコース誘導体又はオリゴラムノース誘導体及びその製造法

(57)【要約】

【課題】 フコースやラムノース多糖類より均一性が高く、またより効果の優れた抗潰瘍効果を有するオリゴフコース誘導体又はオリゴラムノース誘導体を提供する。

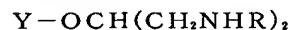
【解決手段】 次の一般式で表される、消化器潰瘍予防・治療作用を有するオリゴフコース誘導体又はオリゴラムノース誘導体。

$Y-OCH(CH_2NHR)_n$

[式中、Yは重合数2~20のオリゴフコース又はオリゴラムノースで、一部の水酸基は硫酸エステル化していてよいオリゴ糖残基を示し、Rはフェニル基、高級アルキルフェニル基、高級アルキル基、又は $-(CH_2)_n-NHX$ (nは1~10の整数、Xは高級アルカノイル基、置換基を有していてよいアルキルアミノ基を示す)]

【特許請求の範囲】

【請求項1】 次の一般式で表されるオリゴフコース誘導体又はオリゴラムノース誘導体。



【式中、Yは重合数2～20のオリゴフコース又はオリゴラムノースであって、一部の水酸基は硫酸エステル化されていてもよいオリゴ糖残基を示し、

Rはフェニル基、高級アルキルフェニル基、高級アルキル基、又は-(CH₂)_n-NHX (nは1～10の整数、Xは高級アルカノイル基、置換基を有していてもよいアルキルアミノ基を示す)】

【請求項2】 オリゴフコース又はオリゴラムノースの還元末端の糖残基を酸化分解によりアルデヒド基とする工程と、

該アルデヒド基に、対応するアルキルアミン、アリルアミン類を作用させてシップ塩基を生成させる工程と、該シップ塩基を還元する工程とを備えた請求項1に記載のオリゴフコース誘導体又はオリゴラムノース誘導体の製造法。

【請求項3】 請求項1記載のオリゴフコース誘導体又はオリゴラムノース誘導体の1種又は2種以上を含むことを特徴とするヘリコバクター・ピロリ(*Helicobacter pylori*)菌用抑制剤。

【請求項4】 請求項1記載のオリゴフコース誘導体又はオリゴラムノース誘導体の1種又は2種以上を含むことを特徴とする消化器潰瘍予防・治療剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、胃及び十二指腸などの消化器粘膜における炎症や潰瘍の発生予防及び治療に有効なオリゴフコース誘導体又はオリゴラムノース誘導体及びその製造法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】 従来、抗潰瘍剤としては胃酸分泌抑制を目的としたH₂-ブロッカーやプロトンポンプ阻害剤が用いられている。また、胃炎や胃粘膜細胞の積極的な治療を目的として、近年ではプロスタグランジンや塩基性繊維芽細胞増殖因子などの利用も検討されている。これら薬剤は有効な治療効果を示すが、近年潰瘍の発症、特に再発にはヘリコバクター・ピロリ(*Helicobacter pylori*)が関与することが示され、消化性潰瘍の根本的な治療には本菌の除菌を含めた治療が必要であることが示されている(*Helicobacter pylori*と胃粘膜病変、浅香正博著、先端医学社)。

【0003】 一方、本発明者らは、ある種のビフィズス菌や乳酸菌、及びモズクや青海苔などから調製される多糖類やオリゴ糖類が、潰瘍の予防のみならず治癒促進にも有効であり、抗潰瘍剤として使用可能なことを先に見出した(特開平6-247861号公報、特開平7-138166号公報)。これらの多糖類やオリゴ糖類はフ

コースやラムノースを主成分とするものである。中でもフコースのポリマーであるフコイダンは潰瘍形成に対する予防効果や治癒促進効果のみならず、ヘリコバクター・ピロリ(*H. pylori*)に対する接着阻害作用も有することを見出した。しかしながらこれら多糖やオリゴ糖そのものは、抗潰瘍活性の点でも満足すべきものでなく、また分子量などの均一性が得にくい。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】 本発明は、上記多糖類より均一性が高く、またより効果の優れた抗潰瘍効果を有するオリゴフコース誘導体又はオリゴラムノース誘導体を提供することを目的とする。

【0005】

【課題を解決するための手段】 このような課題のもと、鋭意研究を行った結果、フコイダン(フコース多糖)やラムナン(ラムノース多糖)を、酸処理などにより、オリゴ糖(フコース又はラムノースの3～20程度のオリゴマー)とし、さらに、過ヨウ素酸酸化、対応するアミン類との反応、及び還元処理により、オリゴ糖誘導体を20 製造し、このものが、優れた抗潰瘍効果などの諸性質を有していることを確認し、本発明を完成した。

【0006】 即ち、本請求項1に記載された発明に係るオリゴフコース誘導体又はオリゴラムノース誘導体は、次の一般式で表される、消化器潰瘍予防・治療作用を有するものである。



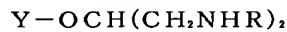
【式中、Yは重合数2～20のオリゴフコース又はオリゴラムノースで、一部の水酸基は硫酸エステル化されていてもよいオリゴ糖残基を示し、Rはフェニル基、高級アルキルフェニル基、高級アルキル基、又は-(CH₂)_n-NHX (nは1～10の整数、Xは高級アルカノイル基、置換基を有していてもよいアルキルアミノ基を示す)】

【0007】 また、本請求項2に記載された発明に係る請求項1に記載のオリゴフコース誘導体又はオリゴラムノース誘導体の製造法は、オリゴフコース又はオリゴラムノースの還元末端の糖残基を酸化分解によりアルデヒド基とする工程と、該アルデヒド基に、対応するアルキルアミン、アリルアミン類を作用させてシップ塩基を生成させる工程と、該シップ塩基を還元する工程とを備えたものである。

【0008】 更に、本請求項3に記載された発明に係るヘリコバクター・ピロリ菌用抑制剤は、請求項1記載のオリゴフコース誘導体又はオリゴラムノース誘導体の1種又は2種以上を含むものである。

【0009】 また、本請求項4に記載された発明に係る消化器潰瘍予防・治療剤は、請求項1記載のオリゴフコース誘導体又はオリゴラムノース誘導体の1種又は2種以上を含むものである。

【発明の実施の形態】本発明が提供することに成功した消化器潰瘍予防・治療効果を有するオリゴフコース誘導体又はオリゴラムノース誘導体は、次の一般式で表されるものである。



[式中、Yは重合数2～20のオリゴフコース又はオリゴラムノースで、一部の水酸基は硫酸エステル化されていてもよいオリゴ糖残基を示し、Rはフェニル基、高級アルキルフェニル基、高級アルキル基、又は-(CH₂)_n-NHX (nは1～10の整数、Xは高級アルカノイル基、置換基を有していてもよいアルキルアミノ基を示す)]

【0011】このオリゴフコース誘導体又はオリゴラムノース誘導体の製造法の一実施の形態は次のようなものである。

【0012】フコイダンやラムナンもしくはラムナン硫酸を含有する海藻類(モズク、クロメ、ヒバマタ、青海苔等)より、多糖を任意の抽出方法(松田和雄著、生物化学実験法 No.20、多糖の分離・精製法、学会出版センター等)にて抽出する。

【0013】得られた多糖類を0.075N～0.1N程度の塩酸もしくはトリフルオロ酢酸の溶液に溶解し100℃、10分～20分、加熱処理し多糖をオリゴ糖化する。処理後、水酸化ナトリウムにて中和し、本液にNaBH₄を加え室温もしくは4℃にて16時間還元処理を行う。(特開平6-247861号公報、特開平7-138166号公報参照)

【0014】の操作により得られたオリゴ糖のアルジトール体の溶液を透析(分画分子量500)もしくは電気透析やイオン交換樹脂を用いて脱塩する。

【0015】の溶液にメタ過ヨウ素酸ナトリウムを加え冰温下で1時間程度反応する(構造的に還元末端及び非還元末端以外の糖鎖が酸化されないようなオリゴ糖、例えば1→3結合のオリゴ糖などの場合はさらに長時間反応しても良い)。反応液に過ヨウ素酸に対し過剰量のエチレングリコールを加え、更に1時間程度反応する。本液をと同様の方法で脱塩する。この操作により、末端にアルデヒド基を有するオリゴ糖誘導体が得られる。

【0016】本液に0.5M濃度となるように酢酸を加え、室温下で20時間反応させる。反応液を分画分子量50の透析膜にて透析し、内液を凍結乾燥し目的とするオリゴ糖を得る。またオリゴ糖画分は透析による脱塩以外にも、活性炭カラムクロマトグラフィーやゲルfiltration等を用いて任意の分子量サイズの画分を脱塩も兼ねて調製してもよい。

【0017】オリゴ糖画分を40～50%のプロパンオールを含む水溶液に溶解しアリルアミン、アルキルアミン類を加え45℃にて2時間反応し、シップ塩基を形成させる。この場合、用いる溶媒はオリゴ糖及びアルキルアミ

ンを溶解しうる物質(ジメチルスルフォキシド、ジメチルホルムアミドなど)であればよい。この場合、反応させるアルキルアミン類、アリルアミン類としては、その選択にとくに制限はないが、置換、非置換のアニリン類、置換、非置換の高級アルキルアミン類、が好ましく、この場合、置換基としては、アルキル基、アルカノイルアミノ基、アルキルアミノ基、などが挙げられる。

【0018】液にボラントリメチルアミンを加え、45℃にて20時間シップ塩基を還元する。還元剤としてはボラントリメチルアミン以外にも、本目的に合致するような還元剤(例えば、ボランジメチルアミン、NaCNBH₃、NaBH₄など)が、適宜利用できる。

【0019】反応終了後、溶媒をエバポレーター等で留去した後、クロロホルム：メタノール：水=2：1：1の混液で分配し、水層を集める。水層をクロロホルムで洗浄後、凍結乾燥することにより、本発明にかかるオリゴ糖アルキルアミン複合体を得る。分配抽出に用いる溶媒は、アルキルアミンの性質により適宜変更してもよい。

【0020】本発明に示されたオリゴ糖誘導体は、消化器潰瘍の原因菌であるヘリコバクター・ピロリ(*H. pylori*)菌の定着阻害効果、及び酢酸誘発潰瘍の治療効果を有することが確認された。

【0021】本発明の消化器潰瘍予防・治療剤の剤形や投与量は任意に選定することができる。しかしながら、一般的には、本剤を薬学的に許容できる液状又は固体状の担体と配合し、かつ必要に応じて溶剤、分散剤、乳化剤、緩衝剤、安定剤、崩壊剤、潤滑剤等を加えて、錠剤、顆粒剤、散剤、粉末剤、カプセル剤等に製剤して使用するのが適当である。また本剤の成人1日当たりの好適投与量は、約0.1mg/kg以上10mg/kg以下、好ましくは0.3mg/kg以上3mg/kg以下である。

【0022】

【実施例】

実施例1. オリゴフコース誘導体の製造

(1-1) フコイダンの抽出及びフコースオリゴ糖の製造
沖縄モズク(*Cladosiphon okamuranus Tokida*)を脱イオン水にて塩抜きを行った後、藻体1kg当たり1リットルの割合で脱イオン水に懸濁し、本懸濁液を塩酸でpH2とした。本液を100℃、10分加熱抽出後、ガーゼにて藻体を濾別し、濾液をさらに遠心し不溶物を除いた(9000rpm, 60分)。

【0023】得られた上清をNaOHにて中和後、0.2M濃度になるようにメタ過ヨウ素酸ナトリウムを加え、混入してくるアルギン酸を分解し、遮光下にて20時間反応後、エチレングリコールにて反応を停止した。本液に水素化ホウ素ナトリウムを0.2M濃度になるように加え室温にて16時間、反応した。本液を限外濾過(分画分子量5,000)にて濃縮後、透析した。透析内液を塩酸にてpH2とし100℃、10分加熱処理した。処理液を透析後、凍結乾燥し

フコイダンを得た(4g/1kg湿藻体)。

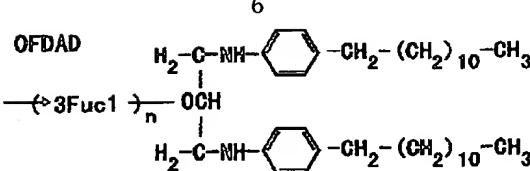
【0024】このフコイダンを200mg/mlの濃度に溶解し、0.075M～0.1M濃度となるように塩酸(若しくはトリフルオロ酢酸)を加えた。100°Cにて10分、加熱後、室温まで冷却した。本液をNaOHにて中和後、NaBH₄をフコイダン1gにつき200mgの割合で加え、4°Cにて20時間反応させた。反応液を酢酸にてpH 6とし、電気透析装置(旭化成、マイクロアシライザー、AC220膜使用)にて脱塩した。脱塩後、試料溶液に0.2M濃度となるようにNaIO₄を加え、氷温下にて1時間反応させた。反応液にエチレングリコールを過ヨウ素酸に対し2当量加え、氷温下にてさらに1時間反応させた。反応液を分画分子量50の透析膜(スペクトラム社製)にて透析し、透析内液を凍結乾燥しオリゴ糖標準を得た(平均分子量約1000～3000、又は平均重合度8～14)。

【0025】(1-2) フコースオリゴ糖の過ヨウ素酸酸化フコースオリゴ糖の溶液(2%、100ml)に0.2M濃度となるようにNaIO₄を加え、氷温下にて1時間反応させた。この反応液にエチレングリコールを当量加え、氷温下にてさらに1時間反応させた。得られた反応液を500ml容量の活性炭カラム(和光純薬製、クロマトグラフィー用活性炭)に添加し、3リットルの水で非吸着物を溶出した。本カラムに3リットルの35%、エタノール水を加え、吸着画分を回収した。この画分をエバポレーターにて濃縮し、オリゴ糖のアルデヒド型誘導体を得た(收率約25%)。

【0026】(1-3) アミン類との反応及び還元反応(1-2)で製造したオリゴ糖のアルデヒド誘導体を50%のn-ブロパノール水に50mg/mlの割合で溶解し、10mg/mlの割合でドデシルアニリンを加える。45°Cにて2時間反応後、ボランジメチルアミン複合体を10mg/mlとなるように加える。45°Cにて20時間反応し、反応液を減圧乾固する。残渣をクロロホルム：メタノール：水=2:1:1の混液を加え分配する。水層を集め、水層にクロロホルムを等量加え、分配洗浄を行う。この操作を2回繰り返した後、水層を凍結乾燥し、オリゴフコースドデシルアニリン誘導体(OFDAD)を得た(收率約64%)。本物質の構造は、メチル化分析及びNMR等の解析結果より以下の化1のように決定された。なお、フコース残基の4位の水酸基の一部は硫酸エステル化されている。図1はオリゴフコースドデシルアニリン誘導体(OFDAD)のNMRスペクトル(¹³C-NMR)図であり、図2はオリゴフコースドデシルアニリン誘導体(OFDAD)のIRスペクトル図である。

【0027】

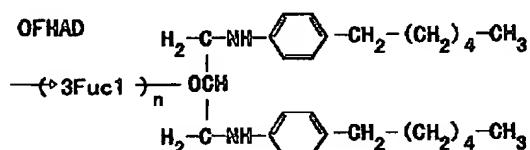
【化1】



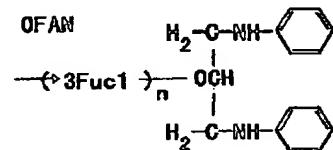
* 【0028】(1-3)と同様に、ドデシルアニリンの代わりに、ヘキシルアニリン、アニリン、もしくはラウリルアミンなどのアルキルアミンと反応させ、反応液を同様に分配し、化2のオリゴフコースヘキシルアニリン誘導体(OFHAD)、化3のオリゴフコースアニリン誘導体(OFAN)、化4のオリゴフコースラウリルアミンアミン誘導体(OF-LA)等のオリゴフコース誘導体を得た。

【0029】

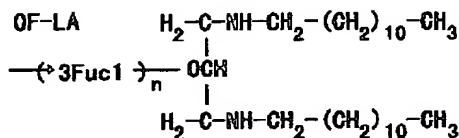
【化2】



【化3】



【化4】



【0030】実施例2. オリゴラムノース誘導体の製造(2-1) ラムノースオリゴ糖の製造

青海苔(ヒロハヒトエ草)の乾燥藻体を10倍量の水に懸濁させ、100°Cに2時間加熱してラムナン硫酸を浸出させた。遠心分離して固体物を除いた後、エタノールを添加し、沈殿した多糖類を集めて水に溶解し、透析により低分子量成分を除いて内液にラムナン硫酸を得た。次いで、ラムナン硫酸を含有する内液に濃度が0.01規定になるように塩酸を添加して100°Cに加熱し、脱硫酸反応を生じさせた。その後、再度透析を行い、内液にラムナンを得た。

【0031】このラムナンを前述のフコイダンの場合と同様の方法で弱酸分解、還元、過ヨウ素酸酸化を同様に行いオリゴ糖アルデヒド型誘導体を調製した(平均分子量約1000～1500)。

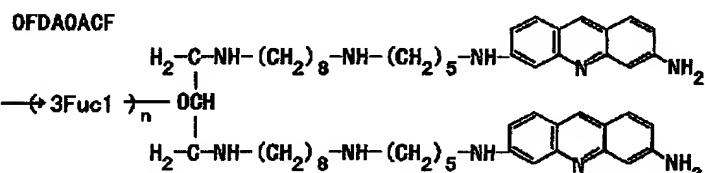
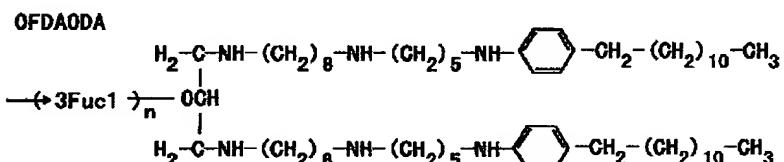
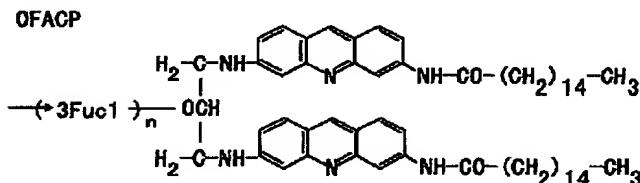
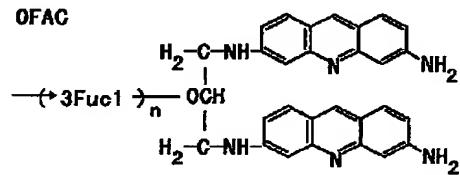
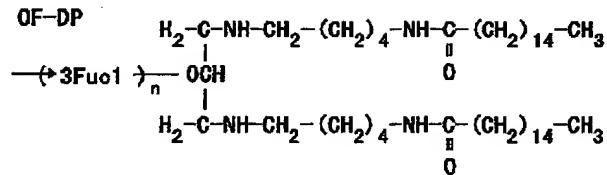
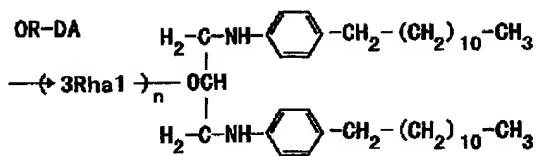
【0032】(2-2) アミン誘導体との反応

本画分とドデシルアニリンを前述と同様の操作により結合させ、化5のオリゴラムノースドデシルアニリン誘導

体(OR-DA)を得た(収率約10%)。

【0033】

【化5】



【0036】実施例3. 抗潰瘍作用の検証1

実施例1で得られたオリゴフコースドデシルアニリンについて、抗潰瘍作用を酢酸誘発潰瘍を用いて試験した。図3は酢酸誘発潰瘍の操作を示す工程図である。図3に示す通り、実験及び効果判定は、8週齢のSDラットに、1日目に20%酢酸 30μlを胃体部に注入して、酢酸誘発潰瘍を発症させ、2日目から9日目まで、1ml試料溶液を1日1回、経口的に投与した。なお、試験期間中、餌及び水は自由摂取とした。

* 【0034】以上に示した実施例1, 2で製造した化1～化5の誘導体以外にも、前述の製造法により、作成した誘導体のリストを以下の化6に示す。

【0035】

【化6】

※ 【0037】最終投与後にラットを絶食し、10日目に胃を摘出して、ホルマリン固定した後、潰瘍部分の短径と長径とを測定(Ulcer index)して、治癒率の評価を行つた。評価は対照群に対し危険率5%以下で効果を認めた場合に、有意とした。なお、治癒率(%)は=(1-投与群の潰瘍の面積/対照群の潰瘍の面積)×100で求めた。結果を次の表1に示す。

【0038】

※ 【表1】

	Ulcer index (Mean \pm SD)	治癒率 (%)
対照群 (11)	11.3 \pm 2.6	—
試料 0.1mg/rat/day \times 8 (10)	6.2 \pm 1.5*	45.0
試料 0.5mg/rat/day \times 8 (10)	8.2 \pm 4.7*	27.8
試料 1.0mg/rat/day \times 8 (10)	6.7 \pm 2.9*	41.1

* : 対照群に対しての危険率が5%以下。

【0039】実施例4. 抗潰瘍作用の検証2

試料溶液を実施例1で得られたオリゴフコースのアルキルアミン誘導体に代えて同様の抗潰瘍作用の検証を行つた。具体的には、試料溶液として、オリゴフコースヘキシルアニリンと、オリゴフコースラウリルアミンとを用い、実施例3と同様の操作を行つて、オリゴフコースヘ

* キシリアニリン及びオリゴフコースラウリルアミンによる酢酸潰瘍に対する効果を検証した。結果を次の表2及び表3に示す。

【0040】

【表2】

	Ulcer index (Mean \pm SD)	治癒率 (%)
対照群 (10)	11.6 \pm 4.3	—
試料 0.1mg/rat/day \times 8 (10)	7.5 \pm 2.8*	35.5
試料 0.3mg/rat/day \times 8 (10)	8.4 \pm 3.8	27.5
試料 1.0mg/rat/day \times 8 (10)	7.8 \pm 2.8*	33.5

* : 対照群に対しての危険率が5%以下。

【0041】

【表3】

	Ulcer index (Mean \pm SD)	治癒率 (%)
対照群	10.3 \pm 3.8	—
試料 0.5mg/rat/day \times 8 (7)	5.1 \pm 2.1*	50.4
試料 2.0mg/rat/day \times 8 (10)	7.2 \pm 3.6	30.3
試料 5.0mg/rat/day \times 8 (10)	9.9 \pm 4.8	4.6

* : 対照群に対しての危険率が5%以下。

【0042】実施例5. 抗潰瘍作用の検証3

オリゴフコースドデシルアニリンによるNSAIDS等により誘発される潰瘍に対する防御効果を検討するため、インドメタシン傷害に対する防御作用について効果検定を行つた。

【0043】具体的な操作は、オリゴフコースドデシルアニリンを0.5%カルボキシメチルセルロース溶液1mlに溶解し、18時間絶食及び2時間絶水したラットに経口投与する。対照群にはカルボキシメチルセルロース溶液

*のみを投与する。試料投与2時間後に50mg/mlのインドメタシンを1ml投与し胃粘膜傷害を惹起する。傷害惹起2時間後に麻酔下にて胃を摘出しホルマリン固定後、傷害部位（出血斑）の長さと幅を測定し、その面積を求め、傷害形成の抑制率を求め、オリゴフコースドデシルアニリンによるインドメタシン胃傷害に対する予防効果を検証した。結果を次の表4に示す。

【0044】

【表4】

	Lesion index (mm ² , Mean \pm SD)	治癒率 (%)
対照群	46.06 \pm 24.72	—
試料 0.5mg/rat/day \times 8 (7)	25.33 \pm 14.57*	45.0
試料 2.0mg/rat/day \times 8 (10)	19.23 \pm 14.67*	58.2
試料 5.0mg/rat/day \times 8 (10)	4.29 \pm 4.48*	90.7

* : 対照群に対しての危険率が5%以下。

【0045】実施例6. ヘリコバクター・ピロリに対する ★ ★ る接着阻害効果及び増殖阻害効果の検定

ヘリコバクター・ピロリ (*H. pylori*) は、消化性潰瘍の原因菌として近年注目されてきた菌である。特に本菌に感染した患者においては、非常に高率で潰瘍の再発が認められ、また抗生素質等の大量投与により、本菌を除菌した患者では再発率が低下することから、消化性潰瘍の再発防止と言う点で本菌の除菌もしくは感染予防が重要視されてきている。事実、欧米では既に潰瘍の治療指針として本菌の除菌が指導されており、また日本においても加齢とともに感染率が増加していることから、今後潰瘍の治療薬にも本菌に対する効果が期待されてくるものと考えられる。

【0046】本菌の除菌には大量の抗生素質とプロトンポンプインヒビターの併用が有効な治療法であるが、耐性菌の問題などから、他の治療法の開発が必要と考えられている。本菌の感染に関しては、胃粘膜層から鞭毛運動により胃上皮細胞へ移行し、胃上皮細胞上のルイスb型 (Leb) 糖鎖のフコース残基を特異的に認識し定着するものと考えられている。本菌の接着においてはシアル酸、スルファチド、ラミニンなどの関与も報告されているが、胃上皮細胞そのものへの特異的接着と言う点では、フコースが重要な認識部位と考えられている。

【0047】特にモズク由来フコイダンには、抗潰瘍効果のみならずこの接着過程を阻害しうることが明らかくなっている(特開平7-138166号公報)。前述のオリゴ糖アルキルアミン誘導体においても *H. pylori* の接着を阻止できれば、本薬剤による潰瘍の治癒促進のみならず、本菌の感染予防及び再発防止を期待できるものと考えられることから、その接着阻害効果についても効果検定を行った。また、増殖阻害効果についても確認した。

【0048】具体的な操作は、P.W.Tangらの方法に従い (Biochem.Biophys.Res.Commun., vol.132, 1985, p474-480)、Leb型糖鎖の還元末端を還元し、この還元末端を過ヨウ素酸酸化したオリゴ糖を調製する。本オリゴ糖をジアミノヘキサンと結合させ、さらにアミノ基固定用マイクロプレート(コバリンクプレート、NUNC社製)に固定化する。本プレートにビオチン標識したヘリコバクター・ピロリ (*H. pylori*) を加え、室温下で1時間反応させる。この時、オリゴフコースドデシルアニリン誘導体を適宜共存させる。反応液を緩衝液で洗い未結合の菌体を除く。

【0049】次いで、各ウェルにストレプトアビジン溶液(50 μg/ml)を100 μl加え、室温下で1時間反応する。これによりウェル中に残っていた菌体にストレプトアビジンが選択的に結合する。洗浄して過剰のストレプトアビジンを除き、次いでペーオキシダーゼ標識したビオチン溶液(2.5 μg/ml)を100 μl加える。室温下で30分、反応させた後、過剰の酵素標識ビオチンを除く。本操作によりビオチン化された菌体に選択的に酵素標識ビオチンが結合し、この酵素活性を基質溶液(KPL社製、AB

TSペーオキシダーゼ基質システム) 100 μlを加え、10分反応させることにより検出した。検出は波長405nmの吸光度を測定することにより行った。測定される吸光度はLeb型糖鎖を認識して結合した菌体量を示すことから、オリゴフコースドデシルアニリン誘導体の添加による吸光度の減少率により、その定着阻害率がわかる。

【0050】上記試験においてオリゴフコースドデシルアニリン誘導体を10~1000 μg/mlの範囲で共存させると、次の表5のオリゴフコースドデシルアニリンによる

10 *H. pylori*のLeb型糖鎖への定着阻害活性の結果に示すように添加量の増加に伴い、吸光度が減少することから、ヘリコバクター・ピロリ (*H. pylori*) とLeb型糖鎖の結合がオリゴフコースドデシルアニリン誘導体により阻害されたことがわかる。

【0051】

【表5】

	試料濃度 (μg/ml)	吸光度 (405nm)
20	0	1.015
	10	0.855
	100	0.486
	1000	0.080

【0052】次に、ヘリコバクター・ピロリ (*H. pylori*) に対する増殖阻害効果を検定するため、オリゴフコースのドデシルアニリンを用いた。0.1%のβサイクロデキストリンを含むブルセラ培地で培養した臨床分離株である *H. pylori* 6-34 (1.5×10⁶CFU/ml) 100 μlを同培地 1 ml に懸濁し、試料(オリゴフコースドデシルアニリン)溶液、10 μlを加え、72時間培養した。効果の判定は対照群の菌液の濁度(OD 600nm)に対する試料液の濁度より次式を用いて増殖抑制率を求め判定した。その結果、71.8%の増殖抑制率が得られた。

$$\text{増殖抑制率 (\%)} = (\text{1 - 試料液の濁度} / \text{対照群の濁度}) \times 100$$

【0053】

【発明の効果】上述のように、本発明によれば潰瘍治癒促進作用とヘリコバクター・ピロリ (*H. pylori*) の定着阻害作用を有し、潰瘍や胃癌に移行する胃粘膜の炎症の予防と治療に有用な薬剤が提供される。特に上述した物質は非常に低用量で消化性潰瘍に対する治癒促進効果や粘膜傷害に対する防御効果を示し、またオリゴ糖化により多糖に比べ物性及び活性において均一な物質を容易に調製できることから、薬剤としての利用も容易に行える点でも優れている。

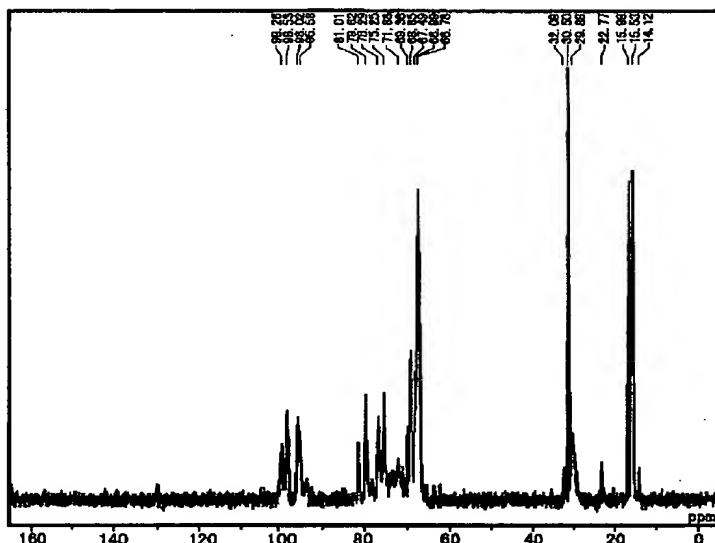
【図面の簡単な説明】

【図1】オリゴフコースドデシルアニリン誘導体(O-F DAD)のNMRスペクトル(¹³C-NMR)図である。

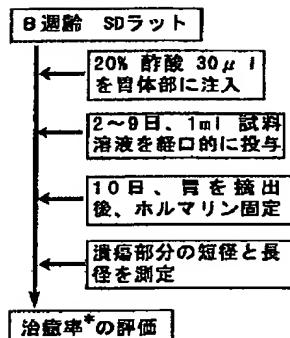
【図2】オリゴフコースドデシルアニリン誘導体(O-F DAD)のIRスペクトル図である。

【図3】酢酸誘発潰瘍の操作を示す工程図である。

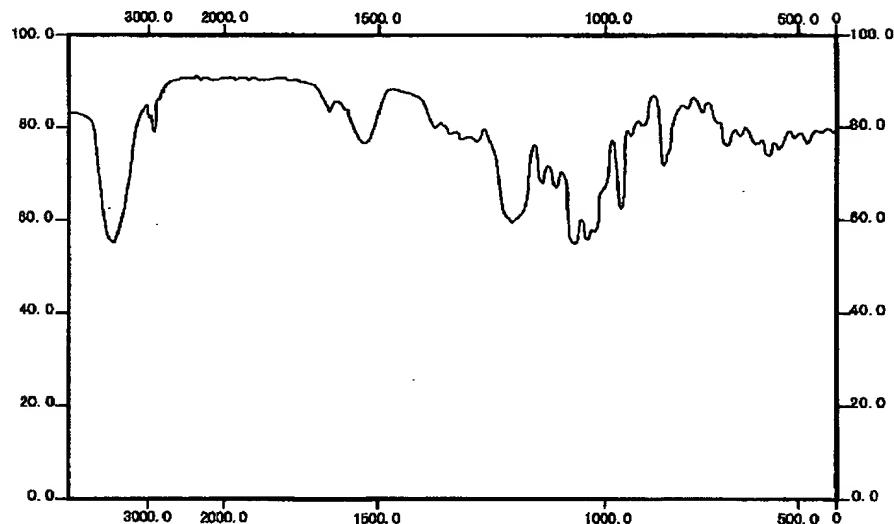
【图 1】



[図3]



【図2】



フロントページの続き

(72) 発明者 橋本 秀介

東京都港区東新橋1丁目1番19号 株式会社ヤクルト本社内